

Title	Nield試薬とビタミンDとの化学反応に関する研究
Author(s)	小林, 正
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29882
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	小 林 正 こ ばやし ただし
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 1 7 3 2 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Nield 試薬とビタミンDとの化学反応に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 川崎近太郎 (副査) 教 授 堀井 善一 教 授 吉岡 一郎 教 授 柘井雅一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔緒 論〕

ビタミンD (以下Dと略称する。Dには現在実用上使用されているものに Calciferol と Cholecalciferol の2種類があるが、Dと呼ぶときには両者の総称を意味する) の SbCl_3 呈色反応に塩化アセチルの存在が不可欠であることは、Nield ら (1940) が発見して以来よく知られた事実であり、塩化アセチルを含む SbCl_3 試薬は、Nield 試薬として現在も Dの比色定量に利用されている。しかし、この呈色反応における塩化アセチル添加の意義については、まったく知られていない。

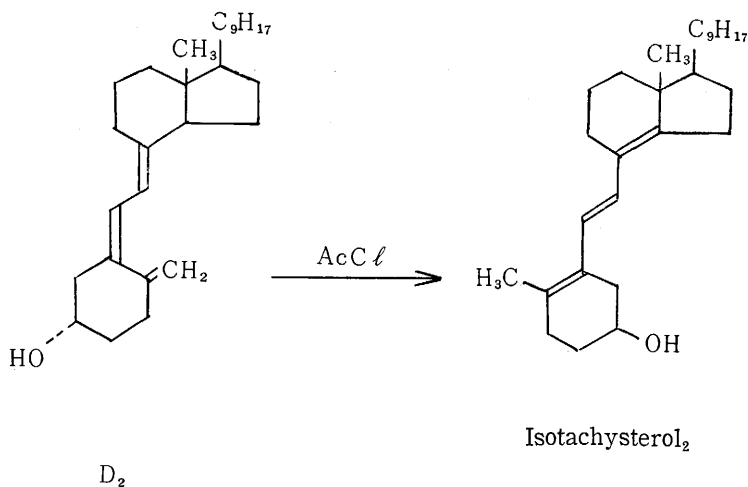
著者はこの事実に着目し、Dの Nield 呈色反応における塩化アセチル添加の意義、ならびにそれにとまなう各種の化学的異性化反応を明らかにする目的で本研究を行なった。その結果、Calciferol (以下 Calciferol を D_2 、Cholecalciferol を D_3 と略称する。また、 D_2 関連化合物は 5, 6-trans- D_2 、Isocalciferol、Isotachysterol₂、Tachysterol₂、Lumisterol₂ と呼び、 D_3 関連化合物は 5, 6-trans- D_3 、Isocholecalciferol、Isotachysterol₃、Tachysterol₃、Lumisterol₃ と呼ぶことにする) に塩化アセチルまたは SbCl_3 を単独で反応させるときは、 $D_2 \rightarrow \text{Isocalciferol} \rightarrow \text{Isotachysterol}_2$ の反応経路で Isotachysterol₂ に異性化されることを明らかにした。一方、 D_3 に Nield 試薬を反応させるときは、Isotachysterol₃ の生成は認められず、Bisteroid A, B と命名された2種の新たな2量体が生成することを明らかにし、Dの Nield 呈色反応機構に新しい示唆をあたえた。

なお、初めに述べたように、Dには現在実用上使用されているものに D_2 と D_3 の2種類があるが、両者の相違は側鎖構造の差のみであり、研究の便宜上、第1～4章では D_2 を使用したが、第5章では D_2 を使用した。

第1章 塩化アセチルによる Calciferol (D_2) の化学的異性化反応

D_2 に塩化アセチルを反応させ、その反応成績体を追及した。 D_2 の塩化エチレン溶液に塩化アセチ

ルを加え、室温で30分間放置したのち、NaOH液を加えて反応を止め、以下常法にしたがって処理して微黄色油を得た。これを3,5Dinitrobenzoateとするとmp 71~74°の橙色結晶となった。本品は、標品との比較から Isotachysterol₂-3,5-dinitrobenzoate と確認された。また本品の不けん化物も Isotachysterol₂ であると確認され、D₂ は塩化アセチルにより Isotachysterol₂ に異性化されることが明らかにされた。



ここで著者は、D₂ の Nield 呈色反応における塩化アセチル添加の意義は、D₂ を Isotachysterol₂ に異性化させることにあるのではないかと推定したが、Isotacoysterol₂ もまた D₂ のばあいと同様、塩化アセチルなしの SbCl₅ 試薬による呈色液の吸光値が低かったので、著者のこの推定は否定された。

第2章 クロマトグラフィーを利用する Calciferol (D₂) およびその関連化合物の分離確認法

第1章において、塩化アセチルにより D₂ が Isotachysterol₂ に異性化される反応を発見したことから、著者はこの異性化反応径路を詳細に検討することを試みた。D₂ の異性化反応を追及するうえでもっとも困難なことは、類似構造を持つ各種の D₂ 異性体が混在したときに適当な分離確認法がないことである。この問題を解決するために、各種クロマトグラフィーの検討を行なった。検討した試料は、D₂, 5,6-trans-D₂, Isocalciferol, Isotachysterol₂, Tachysterol₂, Lumisterol₂, Ergosterol の7種で購入または合成した。

まず充填剤：Chromosorb W (60~80メッシュ) に SE-30 を1.5%被覆したもの、カラム：0.4×75 cm, カラム温度：220°, キャリアーガス (N₂) の流速：90~120ml/分, 装置：島津 GS-1B 型水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー、を条件として用いるガスクロマトグラフィー (以下 GPC と略称する) で、前記試料の分離を試みたところ、D₂ と Lumisterol₂, 5,6-trans-D₂ と Isocalciferol, Isotachysterol₂ と Tachysterol₂ の分離が不十分であった。

つぎに吸着剤：Merck 製 Brockmann アルミナ 1097, カラム：2×25cm, 展開溶媒：ヘキサン・エーテル (2:1), を条件として用いるアルミナカラムクロマトグラフィー (以下アルミナ CPC と略称する) で、前記試料の分離を試みたところ、D₂ と Tachysterol₂, 5,6-trans-D₂ と Isocalciferol, Isotachysterol₂, と Lumisterol₂ の分離が不十分であった。

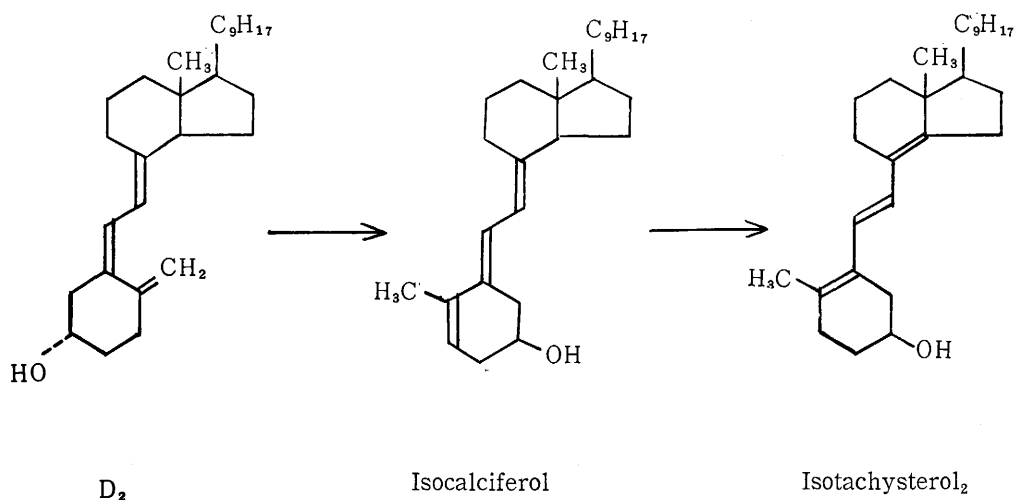
アルミナ CPC または GPC で分離が不十分であった化合物を比較するとき、両法に共通して分離不可能な化合物は、5,6-trans-D₂ と Isocalciferol のみであった。このことはこの2者を除いた他の化合物は、アルミナ CPC と GPC を併用すれば、それぞれの確認が可能であることを示した。5,6-trans-D₂ と Isocalciferol のばあいのみ、両法の適用によっても確認は不可能であった。しかし、両者の紫外外部吸収スペクトル（以下 UV スペクトルと略称する）は異なっており、アルミナ CPC で両者の相当画分の UV スペクトルを詳細に検討すれば、両者の確認は可能であった。以上のように、アルミナ CPC と GPC とを併用し、UV スペクトルの測定を補助手段として用いる D₂ およびその関連化合物の分離確認法を確立した。

なお薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略称する）による分離についても検討したが、D₂ の異性化の研究に利用できるほど十分な分離は得られなかった。

第3章 塩化アセチルによる Calciferol (D₂) の Isotachysterol₂ への化学的異性化反応経路

第2章で示した分離確認法を用いて、第1章で述べた塩化アセチルによる D₂ の Isotachysterol₂ への異性化反応経路を追及した。まず D₂ の塩化エチレン溶液に塩化アセチルを加え、5, 10, 20, 30, 60, 90 分後に NaOH 液を加えて反応を止め、各反応物について UV スペクトルを測定したのち、GPC を行なった結果、D₂→5,6-trans-D₂→Isocalciferol→Isotachysterol₂, または D₂→Isocalciferol→Isotachysterol₂ の2つの反応経路が予想された。

そこで GPC の結果より反応中間体をもっとも多量に含むと思われた20分反応物について、第2章で示した分離確認法を適用したところ、D₂, Isocalciferol, Isotachysterol₂ の存在が明らかにされ、反応経路は D₂→Isocalciferol→Isotachysterol₂ と確認された。



第4章 三塩化アンチモンによる Calciferol (D₂) の化学的異性化反応

Kodicek ら (1966) は D₂ に SbCl₃ を反応させるとき、Isocalciferol に異性化されると推定したが、この推定は UV スペクトルの結果のみから出されたものであり、確実性にとぼしい。そこで第3章と同様の方法を繰り返して SbCl₃ による D₂ の異性化反応を追及した結果、異性化反応物は Isocalciferol ではなく Isotachysterol₂ であること、ならびにその反応経路は塩化アセチルのばあいと同様に D₂→Isocalciferol→Isotachysterol₂ であることを確認した。

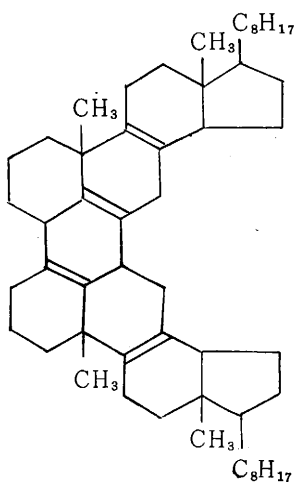
第5章 Nield 試薬と Cholecalciferol (D₃) との化学反応

著者は前章までに、D₂ に塩化アセチルまたは SbCl₃ を単独で反応させるときは、いずれも Isotachysterol₂ に異性化されることを明らかにしたが、本章では D として D₃ を用い、D₃ に Nield 試薬、すなわち、塩化アセチル SbCl₃ とを同時に反応させたときに起る D₃ の変化について検討した。

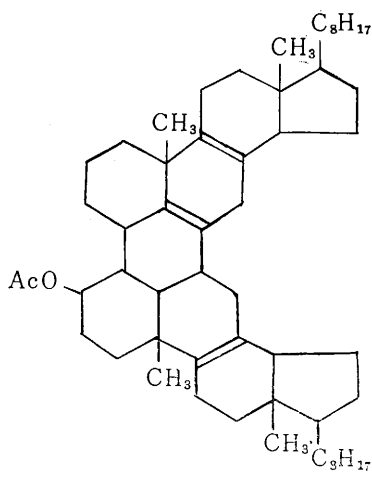
まず D₃ に Nield 試薬を反応させ、その反応成績体を TLC で検索したところ、Rf 0.71 および 0.62 に新物質と思われる2つのスポットが認められたが、D₃ または Isotachysterol₃ に相当する位置にはスポットは認められなかった。そこで D₃ の塩化エチレン溶液に Nield 試薬を室温で5分間反応させたのち、NaOH 液を加えて反応を止め、以下常法にしたがって処理して赤色油を得た。これをシリカゲル CPC で精製して2つの画分を得、アセトンで処理して Bisteroid A (mp 76~78°), Bisteroid B (mp 98~100°) と命名された2種の新2量体をともに微黄色結晶として得た。Bisteroid A は、TLC で Rf 0.71 にスポットをあたえた物質であり、Bisteroid B は Rf 0.62 にスポットをあたえた物質である。

マススペクトル (以下 MS と略称する) の分子ピークは、Bisteroid A では m/e 732, Bisteroid B では m/e 792 であり、この結果ならびに元素分析値、赤外線吸収スペクトル (以下 IR スペクトルと略称する)、核磁気共鳴 (以下 NMR と略称する) の結果より、Bisteroid A は C₅₄H₈₄ の分子式を有する物質、Bisteroid B は C₅₆H₈₈O₂ の分子式を有するモノアセテートであると確認された。

UV ならびに IR スペクトル、NMR、NS、過安息香酸滴定法による二重結合の定量値、さらにオゾン酸化などの結果をもとに判断して、Bisteroid A, B にたいし、次図のような推定構造式をあたえた。



Bisteroid A



Bisteroid B

D₃ に SbCl₃ を単独で反応させるときは、呈色は非常に弱く、その反応成績体は Isotachysterol₃' であるのにたいし、D₃ に Nield 試薬を反応させるときは、呈色は強く、その反応成績体は2量体の Bisteroid A, B であったことから考えて、D₃ の Nield 呈色反応における塩化アセチル添加の意義

は、 SbCl_3 と共同して Bisteroid A, B を形成することにあると思われた。しかし、Bisteroid A, B は分子内に共役二重結合を有しておらず、 SbCl_3 試薬との呈色も非常に弱かったため、Bisteroid A, B と SbCl_3 との分子付加物が呈色物質の本体であるとは考えられなかった。呈色反応は一連の化学反応によるもので、Bisteroid A, B はその結果として生成した反応生成体ということができるであろう。おそらく、 D_2 より Bisteroid A, B が生成する途中の段階で、共役二重結合を有する 2 量体が生成し、これと SbCl_3 の分子付加物 (Halochromic compound) が呈色物質の本体ではないかと推察できた。そしてこの呈色物質は非常に不安定であるために、ただちに SbCl_3 を脱離するとともに異性化されて Bisteroid A, B に転換してしまうのではないかと推察できた。

〔結 論〕

- 1) D_2 の塩化エチレン溶液に塩化アセチルを反応させるとき、 Isotachysterol_2 に異性化されることを発見した。
- 2) D_2 の塩化エチレン溶液に SbCl_3 を反応させるとき、 Isotachysterol_2 に異性化されることを明らかにし、その異性化反応物が Isocalciferol であるという Kodicek らの推論を訂正した。
- 3) アルミナ CPC と GPC を併用し、UV スペクトルの測定を補助手段に用いる D_2 およびその関連化合物の分離確認法を考察した。
- 4) 3) の分離確認法を利用して塩化アセチルまたは SbCl_3 による D_2 の Isotachysterol_2 への異性化反応径路を追及し、ともに $\text{D}_2 \rightarrow \text{Isocalciferol} \rightarrow \text{Isotachysterol}_2$ であることを明らかにした。
- 5) D_2 に Nield 試薬を反応させ、その反応物より Bisteroid A, B と命名した 2 量体を反応生成体として単離し、D の Nield 呈色反応機極、ならびに同反応における塩化アセチル添加の意義について新しい示唆をあたえた。また Bisteroid A, B の化学構造式についても検討し、両者にたいして推定構造式をあたえた。

論文の審査結果の要旨

ビタミンDの化学的定量法として使用されている Nield 試薬による呈色反応について研究し、本試薬の成分である SbCl_3 および CH_3COCl をそれぞれ単独に反応させたときならびに両者を同時に反応させたときの反応生成体を分離して前者の場合は Isotachysterol 後者の場合は 2 種の Bisteroids であることを明かにした。

本研究により Nield 試薬による呈色反応の機構に示唆を与える新しい知見を得たので薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。